

Rec'd PCT/PTO 10 JUN 2005

10/538463 PCT/CN03/00309

# 证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2002 12 10

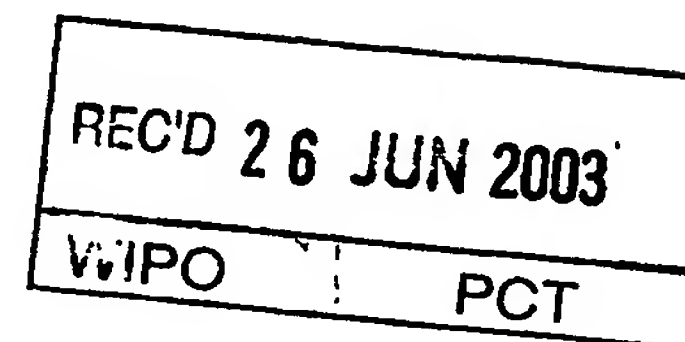
申 请 号: 02 1 54401.8

申 请 类 别: 发明

发明创造名称: 从竹子中提取的三萜总皂甙元的组成、方法及其用途

申 请 人: 杭州浙大力夫生物科技有限公司; 上海筠腾植物提取科技发展有限公司

发明人或设计人: 张英; 吴晓琴; 俞卓裕; 朱云龙; 陈林根; 罗生根

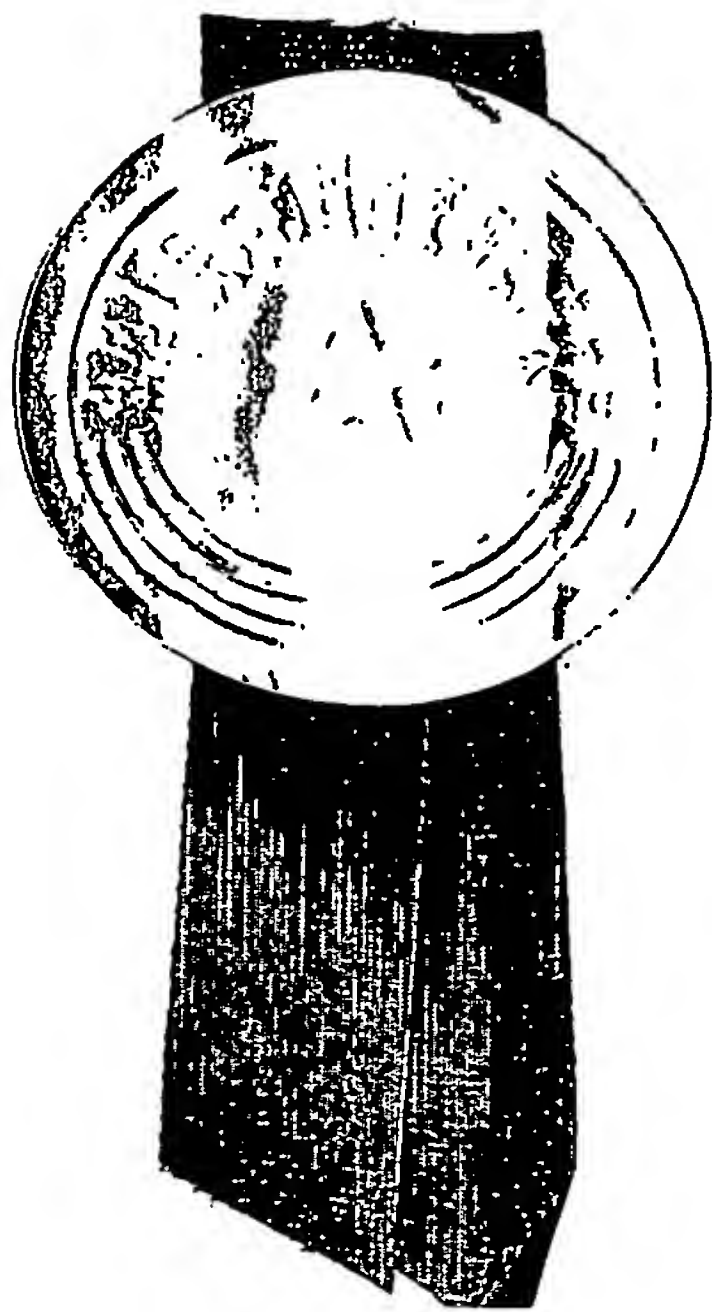


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国  
国家知识产权局局长

王景川

2003 年 5 月 21 日



## 权利要求书

1. 一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组成, 其特征在于: 用香草醛~高氯酸比色法, 以木栓酮为标准品, 测得三萜总皂甙元的含量为 10~90%, 用 GC-MS 联用技术检测其中木栓酮和羽扇豆烯酮的含量分别为 5~35% 和 1%~10%..
2. 根据权利要求 1 所述的一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组成, 其特征在于所说三萜总皂甙元的含量为 40~80%, 木栓酮和羽扇豆烯酮的含量分别为 15~25% 和 3~6%。
3. 根据权利要求 1 所述的一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组成, 其特征在于所说三萜总皂甙元是一组以木栓酮、羽扇豆烯酮及其同系物为主的五环三萜类化合物的混合物, 外观为黄色或黄绿色的粉末, 熔点在 74~79°C 之间; 经溴化钾压片后的红外光谱图显示, 该混合物在 2917、2849、1716、1463、1382 和 720 $\text{cm}^{-1}$  处有特征性吸收峰; 将三萜总皂甙元溶于光谱纯的二氯甲烷后, 在 300~700nm 的波长范围内进行扫描, 显示在 412nm 处有强吸收, 在 665nm 处有次强吸收, 还分别在 505、535 和 605nm 附近有弱吸收。
4. 一种从竹子中提取三萜总皂甙元的方法。其特征在于: 从禾本科刚竹属、籼竹属和牡竹属竹子的竹竿、竹枝、竹叶、竹笋和竹根中提取三萜总皂甙元。
5. 根据权利要求 4 所述的一种从竹子中提取三萜总皂甙元的方法, 其特征在于: 采用超临界  $\text{CO}_2$  流体萃取技术, 即将 10~20 目粒度的竹茹粉末放入  $\text{CO}_2$  超临界萃取釜中, 在温度为 50~65°C、压力为 25~35 兆帕、使用或者不使用夹带剂的状态下, 循环动态萃取 2~5h。
6. 根据权利要求 4 所述的一种从竹子中提取三萜总皂甙元的方法, 其特征在于: 当使用夹带剂时, 所说的夹带剂是甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂, 用量体积比为  $\text{CO}_2$  量的 5~15%。
7. 一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的用途, 其特征在于: 三萜总皂甙元及其木栓酮单体用于制备降血压、抗心衰、抗心肌缺血、抗脑缺血、抗老年性痴呆和抗肿瘤的新药、中西药复方制剂, 以及防治心脑血管疾病和抗肿瘤的保健品、复方制剂。
8. 一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的用途, 其特征在于: 三萜总皂甙元作为护肤、护发因子用于制备日用化妆品, 如护肤品、洗发护发品、沐浴液等。
9. 一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的用途, 其特征在于: 三萜总皂甙元中的五环三萜类化合物用于制备防治心脑血管疾病和抗肿瘤的藥物和保健品, 及其日用化妆品。

## 从竹子中提取的三萜总皂甙元的组成、方法及其用途

### 技术领域

本发明涉及一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组成、方法及其用途。本发明采用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术从竹子中提取三萜类化合物，这是一组以木栓酮、羽扇豆烯酮及其同系物为主的五环三萜类化合物的混合物 (EZR<sub>2002</sub>)，可作为防治心脑血管疾病和抗肿瘤的药物及保健品，并可应用于日用化妆品领域。

### 背景技术

竹子属禾本科 (*Gramineae*) 的竹亚科 (*Bambusoideae*)，是全世界最具利用价值的天然植物之一。全世界约有 70 多属、1200 多种，竹林面积约 2000 万 ha。我国是世界上主要产竹国家，竹林面积约 400 万 ha。我国的竹林面积占国土面积的 0.5%，约占全国森林面积的 2.8%。每年可砍伐毛竹约 5 亿支，各类杂竹 300 多万吨，相当于 1000 余万立方米木材。另外我国竹类的种质资源十分丰富，据统计全国竹类资源有 40 多属 400 余种，约占世界竹类种质资源的三分之一。刚竹属 (*Phyllostachys* Sieb. et Zucc) 全世界有 50 余种，除少数品种外，中国均有出产，其中经济利用价值最高的毛竹林面积约 250 万 ha，占世界毛竹总量的 90% 以上。

我国的竹类资源主要分布在黄河、长江以南 14 个省、市、区的丘陵山区，四川、福建、湖南、江西、浙江五省是我国竹子的主产区，约占全国产量的 80%。据不完全统计，我国有 1 亿多人口全部或部分从竹林和竹林产品加工中获取生活费用。竹类植物作为森林资源的重要组成部分，不仅以其较高的经济价值，被誉为“穷人的金子”，而且具有广泛的生态环境与社会效益。同时，竹类植物作为优良的风景园林植物，景观优美，有着极高的园艺观赏价值和深厚的文化内涵。随着人民生活水平的提高，国家“天然林保护”、“退耕还林还草”、“长江中下游防护林体系”等生态工程建设的逐步实施，竹产品国内外市场的进一步拓展，竹子以其独特的生物学、生态学及多用途等特点，日益受到人们的重视，必将在中国可持续发展战略中发挥越来越重要的作用。

在竹子有效成分及其生物学效应的研究中，以日本和中国所作的工作为主，印度、巴西、美国和韩国等也做过少量研究。各国所研究的竹类对象具有显著的地域特征，一般均选用具有本国资源特色的竹子品种。

日本从 20 世纪 70s 起对赤竹属 (*Sasa* Makino et shbata) 的赤竹亚属 (*Subgen.*

*Sasa*) 中华箬竹亚科 (*Subgen. Sasamorpha*) 中的一类草本型竹子[称竹草, (英) Bamboo grass, 即 *Sasa albomarginata* Makino & Shibata 等品种]进行了系统的研发, 并申报了一系列的国内专利。90s 起, 也有少量研究涉及到刚竹属的品种。

如 Shibata, M. 等人关于竹草提取物的系列研究 [Pharmacological studies on bamboo grass. (1) Acute toxicity and anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of water-soluble fraction (Folin) extracted from *Sasa albomarginata* Makino et Shibata, *Nippon Yakugaku Zasshi*, 1976; Pharmacological studies on bamboo grass. (2) Central depressant and antitoxic actions of a water-soluble fraction (folin) extracted from *Sasa albomarginata* Makino et Shibata, *Nippon Yakugaku Zasshi*, 1975, 71(5):481-490; Pharmacological studies on bamboo grass. (3) Effects on cardiovascular and isolated organs of water-soluble fraction extracted from *Sasa albomarginata* Makino et Shibata, *Yakugaku Zasshi*, 1978, 98(10):1436-1440; Pharmacological studies on bamboo grass. (4) Toxicological and pharmacological effects of the extract obtained from *Sasa albomarginata* Makino et Shibata, *Yakugaku Zasshi*, 1979, 99(6):663-668。Shibata, M. 等 (1980) [Pharmacological studies on bamboo grass *Sasa albomarginata* 5. Combined effects of the extract F-D with Vitamin C, *SHOYAKUGAKU ZASSHI*, 1980, 34(4):274-279]。

Kato, Hiromichi 等 1978 年申报的专利 [Food preservative from bamboo grass, JP Patent 55088687], 用碱水溶液处理竹草的叶和茎以软化细胞膜, 调节到合适的 pH 后, 用纤维素酶、果胶酶或蛋白酶破坏细胞, 然后用非极性或低极性的有机溶剂(如乙酸乙酯或正己烷)萃取, 脱除叶绿素等杂质, 即得到食品保藏剂。Gidoh, M. 等 (1980) 将竹草提取物用于麻风病的治疗 [Studies on search for a promising immunopotentiative substance for treatment of leprosy. (2) on several biological actions of bamboo grass extracts, *Nippon Rai Gakkai Zasshi*, 1980, 49(1):47-53]。

Sakai, Wataru 1980 年申报的专利 [Healthful feed containing bamboo extract, JP Patent 57074049], 描述了用溶剂萃取刚竹属竹子的嫩茎, 将提取物加入到家禽、家畜、鱼贝类、宠物和实验动物等的饲料中, 添加量在 0.1-5.0%, 最适为 0.2-2.0%。Sakai, Wataru 1980 年申报的专利 [Healthful food containing bamboo extract, JP Patent 57039753], 描述了以下内容: 刚竹属竹子的嫩秆破碎后, 用甲醇、乙醇、氯仿、苯或热水在室温下萃取约 2 周; 或被放入容器中, 蒸汽加热至 180°C, 蒸馏后冷却, 得到了精油和水的混合物, 减压浓缩后的产物可加入多种



食品中(0.1-10%)。Sakai, Wataru 还同时还申报了对痔疮有治疗作用的竹提取物, 主要使用干馏或蒸汽蒸馏得到提取物, 然后用硅胶柱分离得到具有疗痔、降压、放松作用的不同活性部位, 其中疗痔部位无论是口服还是外用都具有突出的效应 [Production of bamboo extract having effect for hemorrhoids, JP Patent 57038721]。

Kuboyama, N.等 (1981) 报道了竹叶提取物及其木质素的抗肿瘤活性 [Anti tumor activity of bamboo leaf extracts, *JPN J PHARMACOL*, 1979, 29(SUPPL.):170; Anti tumor activities of bamboo leaf extracts and its lignin, *FOLIA PHARMACOL JPN*, 1981, 77(6):579-596]。Sato, T 等 (1986) 年报道了一种竹叶提取物溶液用于牙龈的治疗 [The use in periodontal therapy of a bamboo leaf extract solution, *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 1986, 28(2):752-757]。

Momose, Takao.等 1986 年申报的专利 [Food containing powder of bamboo grass leaf, JP Patent 63123353], 将竹草放入热水中灭酶, 真空冷冻干燥后得到粉末, 可直接添加到面条、米糕和蛋糕等食品中。Ota, Yoshinori. 1987 年申报了名为“Packaging of solid food in leaf of bamboo grass and apparatus thereof”(JP Patent 63226251) 的专利, 即为直接用竹草包裹软的固体食物, 其实就是我国粽子制作方式的翻版。Sho, Takemori. 1989 年申请的专利报告了酶法水解竹草纤维, 然后用乙醇~水萃取, 获得了大量不含叶绿素的提取物, 在无氧条件下浓缩干燥, 获得了一种食物保藏剂 [Food preservative from extract of bamboo grasses, JP Patent 03098566]。

Otani, K.等 (1990) 用竹草的热水提取物 (Folin) 灌胃大鼠, 发现有显著的抗胃溃疡的作用 [Histo-chemical studies on the anti-ulcer effect of bamboo grass in rats, *Int J Tissue React*, 1990, 12(6):319-332]。Kenji, Matsui.等 1990 年申请的专利, 用一种或多种有机溶剂, 从斑竹、毛竹、金毛竹等刚竹属的竹子中萃取的有效成分能抑制多种头屑生成菌, 防治皮肤老化, 并能抑制脂质过氧化和稳定产品 [Skin, scalp and hair agent containing component of suppressing growth of dandruff fungus extracted from bamboo, JP Patent 03251518]。Susumu, Itoku 1990 年申请的一项专利, 涉及到含有竹草萃取物和竹碳细粉的片剂作为功能性食品 [Tablet containing component extracted from bamboo grass, JP Patent 03215432]。

Nishina, A.等 (1991) 从毛竹的茎皮中检出了抗菌活性成分 2, 6-二甲氧基对苯醌 [2,6-Dimethoxy-p-benzoquinone as an antibacterial substance in the bark of *Phyllostachys heterocycla* var. *Pubescens*, a species of thick-stemmed bamboo, *J of*

*Agric & Food Chem*, 1991, 39(2):266-269]。

Haibara, Kazuyuki 于 1994 年申报了发明专利“含有竹提取物作为风味剂的食盐” [Table salt containing bamboo extract as flavor, JP Patent 96 47380]。Hayashi, Shigeki 1994 年申报的专利称获得了一种含竹子精油的食品添加剂, 能赋予食品竹子的清香 [Bamboo essence-containing food additive and its production, JP Patent 07298852]。

Aoyama, M. (1995) 综述了四种竹草有效成分的药理学作用 [Pharmacological effects of bamboo grass components, *Journal of the Hokkaido Forest Products Research Institute*, 1995, 9(6):1-8]。Kiyooka, Takatoshi. 1995 年申报的发明专利“用有机溶剂萃取法从竹皮中制备脱臭剂” [Manufacture of deodorant from bamboo skin using organic solvent extraction, JP Patent 9794290]。Kiyooka, Takatoshi. 1995 年申报了发明专利“竹子用作食物的保藏” [Bamboo for preservation of food, JP Patent 97 70280]。

Shinano, T. 等 (1996) 研究了用 DMSO 作为溶剂萃取竹草等植物中的叶绿素 a 和 b [Dimethylsulfoxide method for the extraction of chlorophylls a and b from the leaves of wheat, field bean, dwarf bamboo, and oak, *Photosynthetica*, 32(3):409-415]。

Nakanishi, K. 等 (1996) 报道了毛笋 (原笋及煮后) 的挥发性成分, 原笋中的主要成分是醛类物质, 如 hexanal 和 (E)-2-hexenal, 芳香类的碳氢化合物如甲苯 (toluene)、乙苯 (ethylbenzene) 和二甲苯 (xylene); 煮过笋中主要为二甲基硫化物 (dimethylsulfide), 三甲基呋喃 (3-methylfuran) 和丙酮 (acetone) [Volatile components in boiled and raw bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*), *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 1996, 43(3):259-266]。

Haibara, Kazuyuki 1996 年申报的日本发明专利“用竹提取物制造食盐” [Manufacture of table salt with bamboo extract, JP Patent 98165136]。Nishina, Atsuro 等 1996 年申报的发明专利“含有竹提取物的抗过敏剂” [Anti allergy agent containing bamboo extracts, JP Patent 97278662]。Inoue, Tadashi. 等 1996 年申报的发明专利“竹醋酸的纯化方法及其用途” [Method for purification of wood vinegar from bamboo and its uses, JP Patent 97249886]。

Tsunoda, S. 等 (1997) 研究了竹草 (*Sasa senanensis*) 提取物对 SHN 小鼠自发性乳腺癌的抑制作用 [Inhibition by extract of bamboo grass on the growth of spontaneous mammary tumours of mice, *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Meiji*

[ 2 ]

University, 1997, NO.111, pp41-46]。Nishina, Atsuyoshi 等 1997 年申请的日本发明专利“含有竹叶提取物的抗菌纸”[Antibacterial paper containing bamboo extract, JP Patent 9961697]。Watanabe, Mayumi 等 1997 年申请的日本发明专利“含有竹草提取物的抗菌纸和/或含有水溶性叶绿酸碱金属盐的萃余物”[Antibacterial odor-absorbing paper containing bamboo grass leaves extracts and /or extraction residues containing water-soluble metal chlorophyllin alkali metal salts, JP Patent 98310992]。Hashimoto, K.等 1997 年申请的专利, 提供了水浸提法以取代传统烤制竹汁的方法, 得到一种竹茶 [Extraction method of extracting formation component of bamboo as well as extraction liquid thereof and tea of bamboo, JP Patent 10208640]。

Kozukue, E.等(1998)报道了竹笋在室温储藏过程中酚类物质的变化。经聚乙烯吡咯烷酮(PVP)柱吸附后, 用 GC-MS 检出了 23 个峰, 包括 5-脱氢莽草酸、莽草酸、对羟基苯基乙醇、对羟基苯基丙酸和阿魏酸; 用 Toyo pearl 柱结合 GC 和 GC-MS, 分离了咖啡酸和绿原酸 [Identification and changes of phenolic compounds in bamboo shoots during storage at 20 degree C, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1998, 67(5):805-811]。Yamanaka, Satoshi 等(1998)报道了竹子干馏液的抗菌活性及其应用 [Anti-microbial activity of bamboo dry distillate and its application, *Gekkan Fudo Kemikaru*, 1998, 14(9): 57-60]。

Makino, Akimitsu 1998 年申报了日本发明专利“竹提取物作为肉类添加剂” [Bamboo extracts as additives to meat, JP Patent 99346719]。Tatsumi, Hiroki 1998 年申报了日本发明专利“竹碳的成分及其制作的床单” [Bamboo charcoal-containing compositions and sheets thereof, JP Patent 99302547]。Nishina, Atsuyoshi 等 1998 年申请的日本发明专利“含有 VB1 和竹提取物的食品抗菌剂” [Antimicrobial agents containing vitamin B1 salts and bamboo extracts for food, JP Patent 99269020]。Yamada, M. 等 1998 年申报了“含有竹草提取物的功能性食品”的专利 [Bamboo grass leaf extract-containing functional food product and its production, JP Patent 11318386]。Kikuchi, Shingo. 1998 年申报了一种改进的竹草萃取方法 [Process for efficiently extracting extract from leaf and stalk of bamboo grass, JP Patent 11199502]。

Mie University 的 Sakai Koji 等 (1999) 从笋壳中首次分离出 2 种抗氧化成份: 苜蓿素(Tricin)和紫杉叶素(Taxifolin), 并用 POV 方法检测其抗氧化活性分别为  $\alpha$ -生育酚的 10% 和 1% [Isolation of antioxidative compounds from bamboo shoots



sheath, *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 1999, 46(7): 491-493]。

Nagasawa, Hiroshi.等 (2000 年) 还研究了竹草提取物—Sasa Health 对远红外射线引发的小鼠乳腺癌的防护作用[Effects of irradiation with far-infrared ray on the growth of spontaneous mammary tumors in mice and the role of Sasa Health, bamboo grass leaf extract, in this process, *Meiji Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku*, 2000, Vol.122, pp35-44]。

中国素有“竹子王国”之称，竹子在我国有着悠久的食用历史 [胡春水等，竹的药膳史及竹食品开发，竹子研究汇刊, 1999,18(1):27-31]，也是我国中医药和保健品开发的重要资源，对国家中药现代化建设具有重要意义。《中国中药资源志要》内 12694 种中药中，竹类共收集 10 属 32 种，记入《中国药典》1990 版的竹类植物近 5 种。不同竹种的竹叶、竹鞭根、竹茹、竹沥、竹实（米）、竹竿、竹膏、竹黄、竹笋、竹砂仁、竹苓、竹衣、竹精、竹鼠、竹蜂等均有不同疗效[张佐玉等，竹子在中医药和保健品开发中的潜力，中药现代化, 2000,2(3):54~56]。

我国在竹子成分研究及生物利用上做过大量的工作，其中尤以申请者(张英博士等)在竹叶黄酮方面所做的工作较为系统和深入。竹叶提取物 (Extract of Bamboo Leaves, Ebl<sub>971</sub>) 是申请者近年来从我国资源量最为丰富的刚竹属竹种中开发的一种天然生物黄酮类制剂，以碳苷黄酮为主，其中四种主要的黄酮碳苷分别是荭草苷 (Orientin)、异荭草苷 (Homoorientin)、牡荆苷 (Vitexin) 和异牡荆苷 (Isovitexin) [张英，天然功能性竹叶提取物——竹叶黄酮，中国食品添加剂, 2002, (3): 54~58, 66]。Ebl<sub>971</sub> 具有优良的抗自由基、抗氧化、抗衰老、抗菌、抗病毒及保护心脑血管、防治老年退行性疾病等生物学功效[张英等，竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究，竹子研究汇刊, 1996, 15(3):17-24; 张英等，毛金竹叶提取物抗衰老作用的实验研究，竹子研究汇刊 1997,16(4):62-67; 张英，竹叶提取物类 SOD 活性的邻苯三酚法测定，食品科学, 1997,18(5)47-49; Ying Z. et al, The Bio-antioxidative Activity of Functional Factors in Bamboo Leaves, in: Proceedings of The 3<sup>rd</sup> International Conference of Food Science and Technology, October 19-23,1997, Davis, U.S.A. Ed. J. R. Whitaker, Food and Nutrition Press, 1998 pp266-273; 张英，竹叶提取物类 SOD 活性的综合考察，中国食品学报 1998, 2(2):62-66; 张英等，黄酮类化合物清除活性氧自由基效能的比较研究,天然产物研究与开发 1998, 10(4):26-33; 张英等，竹叶功能因子生物抗氧化活性的研究，营养学报, 1998,20(3):367-371; Chun Hu, Ying Zhang, and David D. Kitts, Evaluation of antioxidant and Prooxidant Activities of Bamboo *Phyllostachys nigra*



*Var. Henonis* Leaf Extract in vitro, *J. Agric Food Chem.*, 2000, 48,3170-3176.]。

Ebl<sub>971</sub> 以其丰富的原料来源、明确的功能因子、良好的食用安全性（属实际无毒）、高效稳定的制剂品质（耐水、热、酸解等）和清新甜香的竹子风味，近年来在天然功能性食品添加剂和医药保健品领域崭露头角。2000 年和 2001 年国家专利局分别授权了申请者于 1998 年申请的 2 项发明专利[张英，从竹叶中提取黄酮类化合物浸膏或粉剂的生产方法，中国专利 ZL 98 1 04564.2；张英，一种添加竹叶黄酮提取物的保健啤酒，中国专利 ZL 98 1 04563.4]。

张英等从竹叶及其提取物中还检出了相当含量的非编码的  $\delta$ -羟基赖氨酸，主要以游离单体和小肽的形式存在，从桂竹和金毛竹叶样分别测得其含量占干叶氨基酸总量的 1.33% 和 1.40%，约相当于其中 Lys 含量的 1/4。醇~水提取的过程有富集  $\delta$ -OH-Lys 的作用，其在提取物中的含量远远高于 Lys。进一步的研究发现赖氨酸在  $\delta$  位羟化以后，其生物抗氧化活性远远高于赖氨酸[张英等，羟化赖氨酸清除活性氧自由基作用的研究，无锡轻工大学学报，1998, 17(3):58-61]。这一特殊的非蛋白氨基酸以相当含量存在于竹叶中，可能有着特殊的生物学意义[张英等，竹叶特种氨基酸的存在及其生物学意义，无锡轻工大学学报，1997, 16(1):29-32]。

张英等对竹叶挥发性成分的研究表明，竹叶芬香物质主要是中等链长的含氧化合物。以阔叶箬竹、毛金竹和四季竹为代表，用“同时蒸馏-萃取法”和“大孔树脂顶空吸附法”联合收集芳香成分，用毛细管气相色谱/质谱/计算机联用技术，对竹叶的精油和头香进行剖析[张英等，竹叶精油和头香的 CGC-MS-DS 研究，天然产物研究与开发，1998, 10(4):38-44]。共检出 144 种挥发性化合物，其中 22 种为三种竹叶所共有。芳香成分以醛、醇、呋喃、酮类为主，C5~C8 中等链长的含氧化合物占主导地位，是竹叶清香的物质基础，其中 C6 化合物起了关键作用，重要的 C6 成分有(E)-2-己烯醛、(Z)-3-己烯醇、2-乙基-呋喃、己醛和己烯等。从总体上看，竹叶的主要香味成分不是萜烯属的，它的香气具有典型的绿叶特征，接近于瓜、果、茶的香型。

唐莉莉等的研究发现，从毛竹叶中提取的多糖(BP)是一种中等分子量的酸性杂多糖，主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖六种糖基组成。动物试验的结果表明，BP 能显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力，对移植性 S<sub>180</sub> 肿瘤的抑制率达 50% 以上 [唐莉莉，徐榕榕，丁霄霖，竹叶多糖对小鼠移植瘤的抑制作用，无锡轻工大学学报 1998, 17(3): 62-65]。

张伟等报告了竹叶提取物对食品致病菌的抑制作用，表明对伤寒沙门氏菌、

13

痢疾志贺氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、魏氏梭菌、肉毒梭菌均有不同程度。在相同时间内，竹叶提取物浓度越高，抑制率就越高；同一浓度的提取液，作用时间越长，抑制率也就越高[张伟等，竹叶对食品致病菌的抑菌作用，食品科学，1998, 19(4):37-39] 申请者最新的研究发现，Ebl 对粪肠球菌、化脓性链球菌、表皮葡萄球菌、普通变形杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌均有一定的抑制作用。

其他如国立台湾大学的 Chang ShangTzen 等(1998)报道了用超声波快速提取毛竹表皮的叶绿素[Rapid extraction of epidermis chlorophyll of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) clum using ultrasonics, *Journal of Wood Science*, 1998, 44(1):78-80]。许刚等用超声波从竹叶中提取黄酮[分析化学 2000, 28(8):1055]。吴建中等的“竹叶提取物的制备和抗微生物作用”[食品工业科技 1999, (2):14-15]。李安平等的“用乳酸发酵从竹笋制备竹膳食纤维”[食品工业科技, 1999, (1):38-39]。赵希东等的添加竹笋提取物于葡萄酒酿造[湖南农业大学学报, 1998, 24(3):221-225]。

我国的研究工作基本上都是围绕刚竹属的竹种，尤其是金毛竹、毛竹和桂竹展开的。

印度在竹子方面的工作涉及到竹米营养、竹笋加工、竹纤维制作以及竹叶作为饲料等方面，研究的对象是具有本土资源特色的簕竹属和牡竹属的品种。如 Pathak, N. N. (1979) 年以小鼠为试验对象，报告了在印度作为食物的龙头竹竹米的营养价值 [A study on the promate composition and nutritive value of bamboo (*Bambusa Vulgaris*) grains for mice, *The Indian journal of nutrition and dietetics*, 1979, 16(2):52-53; Nutritive value of bamboo (*Bambusa sp.*) grains for mice, *The Indian journal of nutrition and dietetics*, 1979, 16(9):356-358]。Eyini, M 等(1989)报道了印度簕竹 (*Bambusa arundinacea*) 落叶的水提物对落花生秧苗生长的抑制作用，认为与其中所含的酚类物质有关 [Allelopathic effect of bamboo leaf extract on the seedling of groundnut, *TROP. ECOL.* 1989, 30(1):138-141]。Bhargava, A. 等分析了 7 种竹子不同可食部分的营养价值，发现碳水化合物总量最高的是印度簕竹的种子 (38.0%)，同时 Vc 含量也最高 (50mg/100g)；蛋白质含量最高的是牡竹属的 *Dendrocalamus strictus* 的种子 (13.54%) [Bamboo parts and seeds for additional source of nutrition, *Journal of Food Science and Technology*, 1996, 33(2): 145-146]。Singh, S. G. 及其合作者(1998)研究了竹笋中总酚含量对竹笋发酵过程中乳酸形成的影响 [The role of the contents of total phenolic compounds in

bamboo shoot fermentation to the formation of soibum, *Indian Journal of Hill Farming*, 1995, 8(1):32-37; The effect of contents of total phenolic compounds of bamboo vegetable on the quality of Soibum, *Journal of Phytological Research*, 1998, 11(1):77-80]。Rajebhosale,V.A.等 1998 年将美穗龙竹的叶作为唯一的食料饲喂杂交小牛犊,评价了其营养价值[Nutritive value of bamboo (*Dendrocalamus calostachyus*)leaves for crossbred calves, *Indian Journal of Animal Nutrition*, 1998, 15(1):58-60]。Singh, R. C. P. 等(1998)用箬竹属竹叶水提物进行了动物试验,200mg/kg 的剂量灌胃小鼠、大鼠和猪,30min 后产生了显著的镇痛和解热作用[Preliminary studies on the central sedative and hypothermic effects of *Bambusa bambos* leaves, *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 1998, 20(1):22-24]。

巴西位于南美竹区,以箬竹属和牡竹属的丛生竹为主。巴西曾在牡竹属的龙竹(*Dendrocalamus giganteus* Munro)中检出了致癌物质。Ferreira, V.L.P.等(1992)报道了用不同的加工方法除去龙竹笋中的致癌物质[Elimination of cyanogenic compounds of bamboo shoots *Dendrocalamus-Giganteus* Munro by different processes, *REV ESP CIENC TECNOL ALIMENTOS*, 1992, 32(2):175-184]。Azzini,A.等曾报道将龙竹竹笋加工的废弃物——笋壳和笋衣用作动物饲料,发现其蛋白质含量高达 131.4g/kg、糖 115.3g/kg 和纤维质 235.4g/kg,并含有 213mg/kg 的氰氢酸(hydrocyanic acid),在沸水中处理 20min 后可去除[Mineral and bromatologic characterization of bamboo shoot residues as animal food, *Bragantia*, 1995, 54(2):257-261]。Azzini,A.等用氢氧化钠稀溶液从箬竹属的龙头竹(*Bambusa vulgaris* Schrad)屑中萃取淀粉,发现 5 年生的竹杆中淀粉含量最高,达 75.22g/kg [Starch extraction from bamboo chips treated with sodium hydroxide diluted solution, *Bragantia*, 1996,55(2): 215-219]。

美国本土上基本无竹子,但随着近年来对竹类产品保健作用的不断认识,也有一些研究机构开始了对竹笋等的研究。Purdue 大学食品和营养系的 Story, J. A. 等 1992 在加州 Anaheim 召开的美国实验生物学联邦会议上报告了竹笋降低大鼠血清胆固醇的效应[Bamboo shoots lower serum cholesterol in rats, *FASEB(FED AM SOC EXP BIOL)* J,1992, 6(5): A1653]。Rutgers 大学 He YiHui 的博士论文对竹笋在体内外的降胆固醇作用进行了较为系统的研究,认为主要是植物甾醇在起作用[The hypocholesterolemic effect of bamboo shoot in vivo and in vitro (*Phyllostachys edulis*, Phytosterols) 1998]。另外,1995 年美国还批准了一项有关



15  
竹醋液用于食品保藏的专利[Food product containing antimicrobial composition prepared by dry distillation of bamboo, US Patent 5468493]。

纵观世界各国目前在竹子提取物中所做的工作，其提取手段不外乎水提、有机溶剂萃取和蒸汽蒸馏法几种，对有效成分的化学研究以及与生理和药理活性之间构效关系的研究相当欠缺。

本发明所涉及的植物来源可以是竹子的全株(包括茎、根、叶、枝、笋)，但主要是指竹子的外表皮(Bamboo bark)，所取部位与《中药辞海》(第一卷)[中国医药科技出版社 1993, pp2137~2139]中所载的竹茹基本相同；涵盖的竹种来源及范围也与其相似，并以刚竹属的竹种为主。

《中药辞海》中记载的竹茹[(拼音) Zhuru, (英) Bamboo Shavings]，异名：竹皮(《金匱要略》)、青竹茹(《神农本草经集注》)、淡竹皮茹(《别录》)、淡竹茹(《食疗本草》)、麻巴(《草木便方》)、竹二青(《上海常用中草药》)，为禾本科刚竹属、箬竹属和牡竹属中一些竹种的茎秆所刮下的外皮层或其次一层。正品竹茹一般为2种：淡竹 *Phyllostachys nigra* var. *henonis* (Bean) Stapf ( *P. henryi* Rendle)，又名甘竹(《广群芳谱》)、白竹(江苏)、毛金竹(浙江)；人面竹 *P. aurea* Carr. ex A. & C. Riviere，又名布袋竹(《台湾植物志》)。另有数种也较广泛地作为竹茹引用：粉绿竹 *P. glauca* McClure，又名淡竹(江苏)；桂竹 *P. makinoi* Hayata；篌竹 *P. nidularia* Munro，又名花竹(贵州)、枪刀竹(浙江)、笔笋竹(广东)；刚竹 *P. viridis* (Young) McClure；青秆竹 *Bambusa tuldoidea* Munro；撑篙竹 *B. pervariabilis* McClure；粉单竹 *B. chungii* McClure [*Lingnania chungii* (McClure) McClure]；大头典竹 *Dendroclamopsis beecheyana* (Munro) Keng f. Var. *Pubescens* (P. F. Li) Keng (*Sinocalamus beecheyana* Var. *pubescens* P. F. Li)，又名大头甜竹(《中国竹类植物志略》)；竹 *Dendrocalamus affinis* Rendle ( *Sinicalamus affinis* (Rendle) McClure)。根据所用竹种分布情况来推断，长江流域以散生竹中的淡竹为主，次为人面竹、桂竹、篌竹、粉绿竹、刚竹等，华南与西南地区以丛生竹种中的青秆竹为主，其次有大头典竹、粉单竹、撑篙竹、慈竹等。

竹茹为临床常用中药之一，多用于胃热呕吐、胸膈烦闷等症。竹茹的传统炮制方法是除去杂质，切段或揉成小团经姜汁炒黄后供调配用。始载于(《神农本草经集注》)。历代本草均有记载其功效。如《纲目》谓可治：“伤寒劳复，小儿热痢，妇人胎动。”张璐《本经逢原》：“竹茹专清胃腑之热，为虚烦烦渴，胃虚呕逆之要药；咳逆唾血，产后虚烦，无不宜之。《金匱》治产后虚烦呕逆有竹皮大丸。《千金方》治产后内虚，烦热短气，有甘竹茹汤；产后虚烦头疼、短气、

闷乱不解，有淡竹茹汤。内虚用甘以安中，闷乱用淡以清胃，各有至理存焉。其性虽寒而滑能利窍，可无郁遏客邪之虑。”贾所学《药品化义》：“竹茹，轻可去实，凉能去热，苦能降下，专清热痰，为宁神开郁佳品。主治胃热噎膈，胃虚干吐，热呃咳逆，痰热恶心，酒伤呕吐，痰涎酸水，惊悸怔忡，心烦躁乱，睡卧不宁，此皆胆胃热痰之症，悉能奏效”。清黄宫绣《本草求真》：“竹茹味甘而淡，气寒而滑，凡因邪热客肺，肺金失养，而致烦渴不宁，膈噎呕逆，恶阻呕吐、吐血、衄血等症者皆当服此”。

《中国药典 2002 版》指明竹茹为“淡竹、青秆竹和大头典竹”，性味甘、微寒，归肺、胃经。功能与主治：清热化痰，除烦止呕。用于痰热咳嗽，胆火挟痰，烦热呕吐，惊悸失眠，中风痰迷，舌强不语，胃热呕吐，妊娠恶阻，胎动不安。

然而，中医药对竹茹的成分和药理的研究十分贫乏，导致长期以来竹茹的成分不详、药理不详。仅在《中药辞海》（第一卷）[中国医药科技出版社 1993，pp2138] 提及竹茹中含有 cAMP 磷酸二酯酶抑制作用的成分，为 2,5-二甲氧基-p-苯醌(2,5-Dimethoxy p-benzoquinone)、p-羟基苯甲醛 (p-Hydroxy benzaldehyde)、丁香醛(Syngaaldehyde)等。未见有文献提到过竹茹中三萜类化合物的存在。

相反，在我国民间常用的“中药淡竹叶”[Herba Lophatheri, (英)Common Lophatherum Herb] 的成分描述中提到了三萜类物质。然而，此处的淡竹叶是指禾本科植物淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn 的茎叶（为多年生草本，不属于竹亚科），产于浙江、江苏、湖南、湖北等地。味甘淡，性寒，入心、肾两经。具有清热除烦、生津利尿之功效，可用于热病烦渴，小便赤涩，淋浊，口糜舌疮，牙龈肿痛。在郑建仙主编的《功能性食品》（第二卷）[中国轻工业出版社，1999，p750]中记载：淡竹叶茎叶主要含有三萜化合物和甾类物质：芦竹素（Arundoin）、印白茅素（Cylindrin）、蒲公英赛醇(Taraxerol)、无羁萜（Friedelin）及β-谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、蒲公英甾醇等，其地上部分含酚类物质、氨基酸、有机酸和糖类。然而，最近沈阳药科大学陈泉等人对淡竹叶的成分进行了较为系统的研究[陈泉等，中药淡竹叶的化学成分研究，沈阳药科大学学报，2002,19(1):23-24;和 2002, 19(4):257-258]，前后分离鉴定了 8 个化合物：3,5-二甲氧基-4-羟基苯甲醛、反式对羟基桂皮酸、苜蓿素、苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷、牡荆素、香草醛、胸腺嘧啶和腺嘌呤，没有提到三萜类物质。

多数三萜（triterpenoids）是由 30 个碳原子组成的萜类化合物，被认为是由 6 个异戊二烯缩合而成的。三萜及其皂甙广泛存在于自然界，文献报道游离三萜

主要来源于菊科、豆科、大戟科、楝科、卫矛科、茜草科、橄榄科、唇形科等植物，三萜皂甙在豆科、五加科、葫芦科、毛茛科、石竹科、伞形科、鼠李科、报春花科等植物分布较多。

皂甙是一类重要的生物活性成分，根据其化学结构可分为三萜皂甙和甾体皂甙两大类。近 30 年来，随着有机化合物研究手段的不断进步，很多重要的中草药如人参、三七、绞股蓝、柴胡、黄芪、远志、商陆、桔梗、知母等所含的皂甙得到了系统的研究，其生物活性和药用价值也逐渐地被认识和日益受到重视。该类物质具有多种生物活性，如抗菌、抗病毒、抗癌、抗生育、抗炎、降血脂、降血压、降血糖、免疫调节等，对心血管系统、神经系统、肾上腺皮质系统和酶活性方面都有生理活性，已成为天然药物研究中的一个重要领域 [姚新生主编，天然药物化学（第三版），人民卫生出版社 2001, 257-294；吴寿金等，近年来皂甙药理活性的研究概况，国外医药·植物药分册，1994, 9(6)：246-252]。相关作用简述如下。

### (1) 抗肿瘤活性

文献报道一些三萜和三萜皂甙，特别是具有羧基的该类化合物具有抗肿瘤活性 [Shashi, B et al, Phytochemistry, 1992, 31: 2199]。Ling 等研究了一些四环和五环三萜对七种人癌细胞的抗癌活性的构效关系，发现  $3\beta, 16\alpha$ -二羟基-齐墩果-12-烯在体外对 HE6-1-A 等 6 种癌细胞有抑制活性， $IC_{50}$  为  $10\mu\text{g/ml}$ ，而且  $16\alpha$ -羟基是必需的 [Ling, H.C. et al. Chem Abs, 1982, 97: 120]。以生物活性测试为指导的研究 [Lee, K.H et al. Planta Medica, 1988, 54: 308]，发现夏枯草 (*Prunella vulgaris*) 等三种植物有抗癌活性，追踪研究表明乌苏酸为活性成分，其对淋巴细胞型白血病  $P_{388}$  和  $L_{1210}$  及人肺癌细胞  $A_{549}$  有显著抑制活性。甘草素和甘草酸可抑制小鼠  $B_{16}$  和黑色素瘤细胞的生长，主要是抑制癌细胞的有丝分裂从 G1 期进入 S 期。甘草酸的活性比甘草素大 20 倍 (Abe H, et al. CA 108: 298)。从韭叶柴胡 (*Bupleurum kunningense*) 中分离的柴胡总皂甙对 Ehrlich 癌细胞的  $IC_{50}$  为  $5\sim 10\mu\text{g/ml}$ ，柴胡皂甙  $S_1$ 、 $S_2$  和  $S_5$  可抑制 Hela 细胞和  $L_{1210}$  白血病细胞的生长。常春藤 (*Hedera helix* L.) 提取物在体内和体外试样中对 Ehrlich 癌细胞有细胞毒活性 (Leclercq J Q, et al, Planta Med, 1992, 58: 279)。从欧洲七叶树 (*Aesculus hippocastanum*) 果实中得到的皂甙 hippoesculin 可抑制 KB 细胞的繁殖， $ED_{50}$  为  $3.6\mu\text{g/ml}$  (Konoshima T, et al. J Nat Prod, 1986, 49: 650)。从过江龙 (*Entada saponins*) 中分离到 3 种皂甙对 L-5178y 瘤细胞有明显抑制作用，其  $IC_{50}$  分别为  $3.10$ 、 $0.38$  和  $0.96\mu\text{g/ml}$  (Okada Y, et al. Phytochemistry, 1987, 26: 2789)。苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 种子中



分离的苦瓜甙 A 在 100 $\mu$ g/ml 浓度时对 S<sub>180</sub> 移植性肿瘤细胞 DNA 和 RNA 生物合成的抑制率分别为 58% 和 55% [朱照静等, 药学学报, 1990, 25 (12): 898]。从腺毛唐松草 (*Thalictrum foetidum*) 分离出的 foetoside C 和 cyclofoetoside B, 每天 30~50mg/kg(iv), 连续 10 天, 对大鼠的移植性肿瘤具有明显的抗癌作用, 其中 foetoside C 对治疗耐受性肿瘤效果更为突出 (Rhakimov KD, et al. CA 108:124139)。此外, 七叶一枝花 (*Paris polyphylla*) 中的皂甙对 P<sub>388</sub>、L<sub>1210</sub> 和 KB 细胞均有抑制作用。商陆皂甙可诱导正常人脾细胞诱生 $\gamma$ -干扰素、白细胞介素-2 及淋巴毒素 (LT), 这些诱生的数种淋巴因子对人肺癌细胞株 (SPC-3)、人肝癌细胞株 (SMMC-7721)、人 T 淋巴细胞白血病细胞株及 Hela 细胞均有不同程度的细胞毒作用, 而对人体正常细胞无毒性 [王为民等, 第二军医大学学报, 1990, 11(5):421]。

## (2) 对心血管系统的作用

实验研究发现, 皂苷有降低胆固醇的作用, 其作用机制是由于肠腔内皂苷与胆固醇形成复合体, 使胆固醇很难再被吸收。当大鼠服用大豆皂甙 (2.0g/L) 胶体溶液后, 使胆固醇在小肠的吸收可下降 50% [Sidhu GS, et al. Nutr Rep Int, 1987, 35:615]。人参皂甙 Rb<sub>1</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rg<sub>1</sub> 和 Re 对高血脂的大鼠具有降胆固醇的作用, 其中 Rb<sub>2</sub> 可显著降低大鼠血清中甘油三酯、脂肪酸及总胆固醇的含量, 它可使脂肪组织中脂蛋白解脂酶的活性增加。人参皂甙和三七皂甙还可降低老龄大鼠的血清脂质过氧化物, 具有抗动脉粥样硬化的作用 (Fan P, et al, CA 110:33590)。短毛五加 (*Acanthopanax gracilistylus* var. *pubesens*) 中的总皂甙, 以每日 300 mg/kg 剂量 (ip) 给药 10 天, 能降低高胆固醇的大鼠血清中总胆固醇、VLDL、LDL 和磷脂体的含量, 并可降低动脉粥样硬化的发生率 (Yan Y, et al. CA 108:1613)。此外, 甘草酸可降低胆固醇; 柴胡皂苷可降低由于饲喂胆固醇而引起的血浆胆固醇、甘油三酯和磷脂的升高, 冬青皂甙 (ilexsaponin) B1、皂树皂甙、绞股蓝皂甙和金盏花皂甙等都具有抗小鼠实验性胆固醇的作用。

人参皂甙对心脏功能的影响主要是增加心肌收缩力, 减慢心率, 增加心输出量和冠脉流量 [Wu J, et al.; CA 108:179841; Guan YY, et al. Blood Vessels, 1988, 25:312; 但汉雄等, 中西医结合杂志, 1991, 11(6):364]。西洋参和人参根叶皂甙在 60mg/kg 剂量时, 可明显抑制血瘀大鼠血栓的形成, 降低其红细胞压积, 并能增加血瘀动物的红细胞膜的流动性, 降低血浆比粘度, 改善血液流变性 [杨晓静等, 中草药, 1992, 23(4):195]。

三七总皂甙能降低猫、兔、狗的动脉压, 为钙通道阻滞剂, 对血管有扩展

作用，可增加冠脉流量，减少心肌耗氧量，对失血性休克有一定的防治作用，对大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用（Wu J, et al. CA 109: 539;163201）；三七总皂甙对沙土鼠脑缺血再灌注损伤有明显保护作用，能减少脑缺血 45min 再灌流 6h 的卒中指数，并降低再灌流 24h 的死亡率；三七皂甙 D<sub>1</sub> 对家兔急性脑缺血也有保护作用（李麟仙等，中国药理学通报，1991,7(5):350）。

短毛五加总皂甙具有降低血压、减慢心率、显著增加小鼠心肌营养性血流和心脏缺氧作用，减轻心肌梗塞家兔心电图 ST 段偏移程度，减少病理性 Q 波发生数，与异博定作用相似 [高宝英等，药学学报，1992,27(9):641]；并可明显降低在体和离体大鼠心肌缺血性再灌注性室速、室颤的发生率，保护心肌中 SOD、Cat 酶的活性 [黄莉等，中国药理学与毒理学杂志，1991,5(2):85]；还可抑制正常家兔由多种诱导因素所致的血小板聚集，增加离体家兔胸主动脉 PGI<sub>2</sub> 的产生，提高动脉粥样硬化家兔血浆中的 PGI<sub>2</sub> 水平 [李小芳等，中国药理学与毒理学杂志，1991,5(2):125]。

绞股蓝皂甙可明显抑制小鼠血小板血栓和静脉血栓的形成，血栓平均重量分别下降 34% 和 68%，对家兔血小板 TXB<sub>2</sub> 和主动脉 6-ke-to-PGF<sub>1α</sub> 的生成有明显抑制作用，其 IC<sub>50</sub> 分别为 1.07 和 1.15mg/ml，说明对血栓形成及花生四烯酸代谢均有抑制作用 [吴基良等，中药药理与临床，1991,7(2):39]；绞股蓝皂甙对实验性心肌梗塞具有保护作用，能缩小心肌梗塞面积，抑制血清游离脂肪酸的升高，并降低大鼠梗塞心肌中 MDA 的含量，保护心肌 SOD、磷酸肌酸激酶的活性 [熊维生等，中国药理学报，1990,11(5):427]；绞股蓝皂甙在 1.50 mg/kg 剂量时可明显改善家兔脑缺血 60min 后的脑电图变化，降低脑静脉血中 LDH 和 CPK 活性，改善缺血后脑组织形态学变化，对脑缺血有保护作用 [王竹筠等，中国药理学与毒理学杂志，1992,6(3):204]。

麦冬总皂甙 10mg/kg 剂量可有效地预防和对抗由氯仿和氯化钡诱发的心律失常。其机理与钠和钙通道有关，同时对结扎狗冠状动脉造成心肌缺氧而诱发的室性心律失常也有良好的治疗作用 [陈敏等，中国药理学报，1990,11(2):161]。此外，酸枣仁皂甙、绵毛黄芪皂甙等对正常大鼠和猫均有降压作用。

### （3）抗菌、抗病毒和抗炎活性

用菌种 (*Saccharomyces carlsbergensis*) 在体外进行试验，研究了 49 种三环萜类化合物的抗真菌活性，结果表明 C-27 或 28 位有游离羧基的齐墩果酸和长春藤皂苷元的皂苷具有较强的抗真菌活性 [Manik, C.D et al. Phytochemistry, 1983,22:1071]。某些三环萜类化合物具有抗病毒活性，如 suberosol，一种新的 31

个碳的羊毛脂烷型三萜是从番茄枝科暗罗属植物(*Pollyathia subarosa*)中得到的, 其能在 H9 淋巴细胞中抑制 HIV 复制 ( $ED_{50}$  为  $3\mu\text{g/ml}$ ) [Li, H.Y et al, J. Nat Prod, 1993, 56:1130]。甘草中的三萜可使输血用的血制品中的病毒失活, 甘草次酸 (glycyrrhetic acid) 可 100% 地抑制疱疹性口炎病毒 [Shanbrom, E. et al, US patent, US 5128150, 1992]。有些三萜已作为抗炎药物在临床应用, 如齐墩果酸治疗肝炎, 甘草酸钠是临床常用的抗溃疡药, 雷公藤提取物用于治疗类风湿关节炎、系统性红斑狼疮和肾炎等症。

三萜类化合物中五环三萜 (pentacyclic triterpenoids) 类型数目较多, 主要的类型为齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇豆烷型和木栓烷型。其中木栓烷 (friedelane) 在生源上是由齐墩果烯羟甲基移位而演变来的。雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 为卫矛科植物, 在我国作为民间用药有很长历史, 近几年临床应用日趋广泛, 特别是对类风湿疾病有独特疗效, 引起国内外广泛重视, 从中已分离得到多种三萜, 有一类为木栓烷类三萜。如雷公藤酮 (tripterone) 是由雷公藤去皮根中心分离出的三萜化合物, 化学名为 3-hydroxy-25-nor-friedel-3, 1(10)-dien-2-one-30-oic acid, 是失去 25 位甲基的木栓烷型衍生物。从卫矛科植物 *Kokona zeylanica* 已分离鉴定的木栓烷类化合物或其降解产物有 20 余个, Leslie 等从该植物茎皮得到 11 个化合物, 均为木栓烷-3-酮类化合物。

三萜化合物的提取与分离方法大致分为四类: 一是用乙醇或甲醇提取, 提取物直接进行分离; 二是用醇类溶剂提取后, 提取物依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯等溶剂进行分部提取, 然后进一步分离, 三萜成分主要从氯仿部位中获得; 三是制备成衍生物再作分离, 即将提取物先用乙醚提取, 用重氮甲烷甲基化, 制成甲酯衍生物, 或将提取物按常法进行乙酰化制成乙酰衍生物, 然后进行分离; 四是有许多三萜化合物在植物体中是以皂苷形式存在, 可在三萜皂苷水解后获得, 即将三萜皂苷进行水解, 水解产物用氯仿等溶剂萃取, 然后进行分离。用化学溶剂提取, 不但工艺流程长, 溶剂消耗大, 操作环境差, 更重要的是提取物的产品质量不稳定, 容易出现重金属和农残含量偏高, 且提取的收率较低。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种从竹子中提取的三萜总皂甙元的组成、方法及其用途。

竹子中提取的三萜总皂甙元的组成: 用香草醛~高氯酸比色法, 以木栓酮为标准品, 测得提取物中三萜总皂甙元的含量为 10~90%; 用 GC-MS 联用技术检测, 其中木栓酮和羽扇豆烯酮的含量分别为 5~35% 和 1%~10%。



竹子中提取三萜总皂甙元的方法，是从禾本科刚竹属、箬竹属和牡竹属竹子的竹竿、竹枝、竹叶、竹笋和竹根中提取三萜总皂甙元。特别是指采用超临界  $\text{CO}_2$  流体萃取技术，从刚竹属、箬竹属和牡竹属品种的茎秆所刮下的外皮层或其次一层（称竹茹）中提取三萜类化合物的方法。

三萜总皂甙元及其木栓酮单体用于制备降血压、抗心衰、抗心肌缺血、抗脑缺血、抗老年性痴呆和抗肿瘤的新药、中西药复方制剂，以及防治心脑血管疾病和抗肿瘤的保健品、复方制剂。

三萜总皂甙元作为护肤、护发因子用于制备日用化妆品：护肤品、洗发护发品、沐浴液等。

三萜总皂甙元中的五环三萜类化合物用于制备防治心脑血管疾病和抗肿瘤的的药物和保健品，及其日用化妆品。

本发明的优点是：提供了一组具有多种生理和药理活性的五环三萜类化合物的竹类来源；采用超临界  $\text{CO}_2$  流体萃取技术实现了竹茹中三萜总皂甙元的高效提取，得到了高精度、高质量的产品，并摸清了其组成成份及其含量变化范围；同时对竹子三萜总皂甙元及其代表性化合物（木栓酮）的降压作用、抗肿瘤活性及其皮肤生理功效进行了系统的研究，表明其在医药、保健品和日用化妆品领域有着广阔的应用前景。

### 附图说明

图 1 是 EZR<sub>2002</sub> 的红外谱图(经溴化钾压片)；

图 2 是 EZR<sub>2002</sub> 的紫外谱图（溶于光谱纯的二氯甲烷）；

图 3 是 EZR<sub>2002</sub> 的 GC-MS 谱图（同时示木栓酮的质谱棒图）；

图 4 是 EZR<sub>2002</sub> 的 GC-MS 谱图（同时示羽扇豆烯酮的质谱棒图）；

图 5 是木栓酮标准品的 GC-MS 谱图；

图 6 是羽扇豆烯酮标准品的 GC-MS 谱图。

### 具体实施方式

本发明用超临界  $\text{CO}_2$  流体萃取技术从禾本科刚竹属、箬竹属和牡竹属的竹子（包括竹竿、竹枝、竹叶、竹笋和竹根茎）中、特别是从刚竹属品种的竹茹中提取三萜类化合物的方法。

本发明的实施方案如下：

将竹茹粉末(一般控制在 10~20 目的粒度)放入  $\text{CO}_2$  超临界萃取釜中，在温度为 50~65℃、压力为 25~35 兆帕、使用或不使用夹带剂的状态下，循环动态萃取 2~5h，得到竹茹提取物(EZR<sub>2002</sub>)。使用的夹带剂可以是甲醇、乙醇和丙酮

等有机溶剂，用量一般为 CO<sub>2</sub> 量的 5~15%(v/v)。

以下的优选例对本发明作详细描述，但并不构成对本发明的限制。

例 1 将 5.5kg 粒度为 20 目的淡竹(*Phyllostachys nigra* var. *henonis*, 又名毛金竹或金毛竹)的竹茹粉末放入萃取釜内，升温到 55°C，开动 CO<sub>2</sub> 泵，升压到 30 兆帕，通过预热器进入萃取釜内；开启夹带剂泵，使 10% 体积比的丙酮通过预热器后同时进入萃取釜，在 55°C 下进行动态萃取 3h。分离釜 1 设定分离压力为 8 兆帕、温度为 45°C，分离釜 2 设定分离压力为 5~6 兆帕、温度为 27~30°C；从分离釜 1 中取出目标产物，经低温干燥、粉碎后，得到竹茹提取物(EZR<sub>2002</sub>) 121 克，产率约为 2.2%；并从分离釜 2 中回收夹带剂。

例 2 除采用毛竹(*Phyllostachys pubescens*, 又称楠竹)的竹茹为原料，萃取温度为 60°C，压力为 25 兆帕，时间为 5h 外，夹带剂改为 10% 体积比的乙醇外，其余条件与例 1 相同，EZR<sub>2002</sub> 的产率约为 1.8%。

本发明还提供了用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取手段得到的竹茹提取物(代号为 EZR<sub>2002</sub>)的产品特征。

EZR<sub>2002</sub> 是一组以木栓酮、羽扇豆烯酮及其同系物为主的五环三萜类化合物的混合物，外观为黄色或黄绿色的粉末，熔点在 74~79°C 之间。经溴化钾压片后的红外光谱图显示，该混合物在 2917、2849、1716、1463、1382 和 720cm<sup>-1</sup> 处有特征性吸收峰(见附图 1)。将 EZR<sub>2002</sub> 溶于光谱纯的二氯甲烷后，在 300~700nm 的波长范围内进行扫描，显示在 412nm 处有强吸收，在 665nm 处有次强吸收，还分别在 505、535 和 605nm 附近有弱吸收(见附图 2)。

用香草醛~高氯酸比色法(详见王光亚主编，保健食品功效成分检测方法，中国轻工业出版社，2002，pp83-94)，以木栓酮为标准品，测得 EZR<sub>2002</sub> 不同批次间三萜总皂甙元的含量在 55~75% 之间。经 GC-MS 联用技术的分析和检测，显示其中主要的游离三萜是木栓酮(friedelin)、木栓醇(friedelan-3-β-ol)、羽扇豆烯酮(lupenone)和羽扇豆醇(lupeol)等五环三萜类的化合物。其中 MS-GS 联用分析的实验条件如下：

仪器：Agilent 公司的 GC 6890~MS 5973；

GC 条件：

检测器：FID, 280°C；

柱：HP5 毛细管柱；

载气：N<sub>2</sub>；

H<sub>2</sub> 流速 30ml/min；

空气流速 200ml/min;

尾冲气流 50ml/min;

程序升温: 在 100°C 下保持 2min 后, 以 20°C/min 的速率上升到 270°C, 保持 50min。

进样: 不分流进样, 进样量 1 $\mu$ l, 温度 280°C。

MS 的条件:

柱: HP5-MS 毛细管柱;

载气: 氮气;

柱流速: 1ml/min;

程序升温: 在 100°C 下保持 3min 后, 以 20°C/min 的速率上升到 270°C, 保持 50min。

检测方式: 扫描质量范围 18-500m/z, 倍增管电压 1600ev; 数据库为 NIST98。

经与从法国 EXTRASYNTHESE 公司购买的木栓酮和羽扇豆烯酮标准品 (HPLC 纯) 的 GC-MS 对照分析和定量检测, EZR<sub>2002</sub> 不同批次间木栓酮的含量平均为 (20.2 $\pm$ 5.2)%, 羽扇豆烯酮的含量平均为 (5.2 $\pm$ 1.5)%。EZR<sub>2002</sub> 样品及其木栓酮和羽扇豆烯酮标准品的 GC-MS 谱图见附图 3~附图 6。

本发明还同时包括了竹茹提取物 (代号为 EZR<sub>2002</sub>) 作为防治心脑血管疾病、抗肿瘤的药物和保健品, 及其作为护肤因子在日用化妆品中的用途。

以下实例仅作为本发明产品用途的阐述, 并不构成对本发明的限制。

#### 例 3 EZR<sub>2002</sub> 的抗自由基活性

采用 Vc-Cu<sup>++</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-酵母多糖的羟自由基 ( $\cdot$ OH) 产生体系, 用化学发光法测定[张英等, 竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究, 竹子研究汇刊, 1996, 15(3):17-24], 测得 EZR<sub>2002</sub> 对羟自由基的 IC<sub>50</sub> 为 (39.6 $\pm$ 10.5) $\mu$ g/ml; 用比色法测得 EZR<sub>2002</sub> 对 DPPH 自由基的 EC<sub>50</sub> 为 (300.4 $\pm$ 50.6) $\mu$ g/ml; 显示了相当强的清除活性氧自由基的能力, 具有作为生物抗氧化剂应用的潜力。

#### 例 4 EZR<sub>2002</sub> 对自发性高血压大鼠的降压作用 (委托中科院上海药物所进行)

##### 4.1 试验原材料

EZR<sub>2002</sub> 用吐温-80 助溶, 分别加蒸馏水配制成 20 和 60mg/ml 的溶液, 临用时新鲜配制; 对照组给予 20%吐温-80, 体积为 0.5ml/100g 体重。

自发性高血压大鼠 (SHR): 18 周龄, 雄性, 体重在 300~365 克, 由中科院上海实验动物中心提供, 动物合格证号: 沪动合证字 152 号。



## 4.2 实验方法

清醒大鼠血压测定采用 SHR 大鼠电子血压仪（北京中日友好医院生产）进行尾动脉间接测压法，将大鼠置于 38℃ 温箱内加热 15~20min，同时测定收缩压和心率。

自发性高血压大鼠 18 只，随机分为三组：对照组给予吐温，EZR<sub>2002</sub> 分设 100mg/kg/d 和 300mg/kg/d 二个剂量，每组 6 只。大鼠在给药前一周开始测压，待血压稳定后开始实验，每天给药一次，连续一周，并分别在给药后的第 1、4 和 7 天测定大鼠血压。在首次给药时，先测定大鼠给药前血压，然后灌胃给药，并分别测定 2、4、6h 药物对大鼠的降压作用。结果显示 EZR<sub>2002</sub> 的降压作用在 4~6h 到达峰值。在第 4 和第 7 天实验中，测压的时间定在给药前（即前次给药后 24h）和给药后 4h 进行。

## 4.3 试验结果

EZR<sub>2002</sub>100mg/kg/d 给药组，实验第一天给药前大鼠的收缩压为 195±8mmHg，给药后 2h 下降至 179±14mmHg，给药后 4h 和 6h 分别为 169±18 和 165±19mmHg，均较给药前明显下降（ $p<0.05$  和  $p<0.01$ ）。EZR<sub>2002</sub>300mg/kg/d 给药组，给药前大鼠的收缩压为 199±7mmHg，给药后 2h 下降至 188±12mmHg，给药后 4h 和 6h 分别为 181±14 和 179±6mmHg，均较给药前明显下降（ $p<0.05$  和  $p<0.01$ ），见表 1。

表 1 EZR<sub>2002</sub> 不同剂量灌胃给药对自发性高血压大鼠血压的影响（n=6）

组别	给药前	给药后时间（h）		
		2	4	6
对照组	191±15	189±13	193±12	180±11
100mg/kg/d	195±8	179±14*	169±18**	165±19**
300mg/kg/d	199±7	188±12	181±14*	179±6**

\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , 与给药前比较。

EZR<sub>2002</sub>300mg/kg/d 给药组大鼠，测定第四天给药前的血压（相当于前一天给药后 24 小时）分别为 193±8 和 189±20mmHg，与对照组大鼠的血压（190±18mmHg）无明显差别。同样，测定两组大鼠第七天给药前的血压（相当于前一天给药后 24 小时）分别为 184±13 和 187±18mmHg，与对照组大鼠的血压（187±20mmHg）亦无明显差别。表明 EZR<sub>2002</sub> 的降压作用维持时间小于 24 小时。见表 2。

表 2 EZR<sub>2002</sub> 对自发性高血压大鼠血压的影响 (n=6)

组 别	第一天给药前	第四天给药前	第七天给药前
对照组	191±15	190±18	187±20
100mg/kg/d	195±8	193±8	184±13
300mg/kg/d	199±7	189±20	187±18

EZR<sub>2002</sub>100 和 300mg/kg/d 剂量组的大鼠在给药的 7 天中, 观察第一天、第四天、第七天的大鼠血压, 均显示有明显的降压作用, 见表 3。给药期间同时观察大鼠心率, 结果显示 EZR<sub>2002</sub> 对大鼠的心率没有明显的影响, 见表 4。而对照组大鼠在实验期间血压无明显变化, 见表 1、表 2 和表 3。

表 3 EZR<sub>2002</sub> 不同剂量灌胃给药对自发性高血压大鼠血压的影响 (n=6)

组 别	给药前	给药后天数		
		1d	4d	7d
对照组	191±15	193±12	180±19	185±25
100mg/kg/d	195±8	169±18**	165±14**	162±9**
300mg/kg/d	199±7	181±14*	176±19*	178±14*

\*p<0.05, \*\*p<0.01, 与给药前比较; 给药后 4h 测定。

表 4 EZR<sub>2002</sub> 不同剂量灌胃给药对自发性高血压大鼠心率的影响\* (n=6)

组别	给药前	给药后天数		
		1d	4d	7d
对照组	374±77	391±50	402±55	424±54
100mg/kg/d	355±42	332±38	353±69	399±65
300mg/kg/d	357±48	344±30	395±67	446±37

\*给药后 4 小时测定。

4.4 结论 竹茹提取物 (EZR<sub>2002</sub>) 对自发性高血压大鼠具有明显的降压作用。

例 5 EZR<sub>2002</sub> 及其分离组分的抗肿瘤活性

5.1 ZR<sub>2002</sub> 的抗肿瘤活性体外筛选 (委托中科院上海药物所进行)

5.1.1 筛选方法 磺酰罗丹 B(sulforhodamine B, SRB)蛋白染色法  
四氮唑盐(microculture tetrazolium, MTT)还原法

5.1.2 细胞株 P<sub>388</sub> 小鼠白血病; A<sub>549</sub> 人肺腺癌。

5.1.3 作用时间 48 小时和 72 小时。

5.1.4 活性评定指标

无效:  $10^{-5}\text{mol/L} < 85\%$   
弱效:  $10^{-5}\text{mol/L} \geq 85\%$  或  $10^{-6}\text{mol/L} > 50\%$   
强效:  $10^{-6}\text{mol/L} \geq 85\%$  或  $10^{-7}\text{mol/L} > 50\%$

表 5 ZER<sub>2002</sub> 对肿瘤细胞 (P<sub>388</sub> 小鼠白血病) 生长的抑制作用\*

试样浓度	抑制率 (%)					活性评价
长春新碱 (mol/L)	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	强 效
	93.1	94.3	94.8	94.7	93.2	
EZR <sub>2002</sub> (mg/mL)	1	0.25	0.063	0.016	0.004	有活性
	90.7	98.2	90.4	57.7	0	

\* MTT 还原法; 作用时间 48 小时。

表 6 ZER<sub>2002</sub> 对肿瘤细胞 (A<sub>549</sub> 人肺腺癌) 生长的抑制作用\*

试样浓度	抑制率 (%)					活性评价
长春新碱 (mol/L)	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	弱 效
	71.3	71.6	66.5	44.3	9.6	
EZR <sub>2002</sub> (mg/mL)	1	0.25	0.063	0.016	0.004	有活性
	70.2	90.6	24.8	0	0	

\*SRB 蛋白染色法; 作用时间 72 小时。

5.1.5 实验结果: 见表 5 和表 6。

5.1.6 结论: EZR<sub>2002</sub> 对 P<sub>388</sub> 小鼠白血病和 A<sub>549</sub> 人肺腺癌细胞株均显示有抑制作用, 具有抗癌活性。

5.2 从 EZR<sub>2002</sub> 中分离得到的木栓酮的体外抗癌作用

为了进一步评价 EZR<sub>2002</sub> 的抗肿瘤能力, 申请者又采用硅胶柱层析和逆流色谱制备技术, 从中分离得到了木栓酮单体组分, 经 GC-MS 分析确认其纯度为 90.5%。委托沈阳药科大学的国家沈阳新药安全评价研究重点实验室采用 MTT 方法, 对木栓酮单体试样的体外抗癌活性进行了测定。

5.2.1 细胞株

本次实验选用 A<sub>375</sub>(人黑色素瘤)、L<sub>929</sub>(小鼠肺上皮癌)、Hela (人宫颈癌)、THP-1 (人巨噬组织瘤) 四种细胞株用作活性筛选。其中前三种为贴壁细胞, 第



四种为悬浮细胞。

### 5.2.2 实验材料及培养条件

所用细胞均培养于 RPMI-1640 培养液中，培养液中含有 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100 $\mu$ g/mL 链霉素、0.2%NaHCO<sub>3</sub>。各成分均用去离子三蒸水配制，溶解后用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌，胎牛血清使用前 56℃、30min 灭活。细胞在上述培养液中于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 浓度的培养箱中培养。

### 5.2.3 方法和结果

取对数生长期的 A<sub>375</sub>、L<sub>929</sub>、Hela 细胞，将细胞密度调至 5×10<sup>4</sup> 个/mL，由于 THP-1 较小，其密度调至 1×10<sup>5</sup> 个/mL，接种于 96 孔版内 (100 $\mu$ l/well)。悬浮细胞培养 4h 后加试样，贴壁细胞培养 12h 后加试样。木栓酮试样事先溶于 DMSO，超声波助溶，再溶于培养液中 (DMSO 不超过 0.1%)，取 7.5、15、30、60、120、240、480 和 960 $\mu$ mol/L 八个试样浓度，每个浓度设四个平行孔，同时设阴性对照。细胞加样后继续培养 24h 和 48h 后，向细胞液中加入 MTT 溶液(浓度为 5mg/mL) 15 $\mu$ l/well。

培养 48h 后，1500rpm 离心 5min，吸弃上清，向细胞中加入 DMSO (150 $\mu$ l/well)，微量震荡器震荡 10min，将结晶完全溶解，酶标仪在 492nm 处测定吸光度 (OD 值)。计算药物对细胞增殖的抑制率，并采用 Bliss 法计算木栓酮的半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)，结果见表 7。

### 5.2.4 与阳性对照物的比较

本实验采用去甲斑蝥素作为阳性对照，表 8 为 120 $\mu$ mol/L 的去甲斑蝥素 24h 和 48h 时对 A<sub>375</sub> 细胞、L<sub>929</sub> 细胞和 Hela 细胞的抑制率，并列出了相对应的木栓酮的数据。

表 7 从 EZR<sub>2002</sub> 中分离得到的木栓酮试样对四种癌细胞的抑制率和 IC<sub>50</sub>

试样浓度 ( $\mu$ mol/L)	抑制率 (%)							
	A <sub>375</sub> 细胞		L <sub>929</sub> 细胞		Hela 细胞		THP-1 细胞	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
7.5	0	0.51	5.42	17.29	34.96	19.99	4.89	8.6
15	6.43	6.29	10.36	21.64	34.69	17.18	0	0
30	0.43	17.18	13.15	38.84	33.30	24.6	3.04	7.57
60	14.12	44.44	22.74	66.82	43.45	41.38	45.25	52.61
120	36.70	88.59	37.57	81.13	71.59	85.96	58.8	77.35

240	44.82	100.28	52.26	99.45	88.19	99.53	68.52	95.02
480	63.27	96.13	48.13	98.17	88.10	97.99	74.09	92.93
960	60.36	89.78	38.87	89.86	73.80	91.98	70.83	82.46
IC <sub>50</sub>	356.54	61.52	665.42	36.94	61.25	64.69	85.10	58.04

表 8 去甲斑蝥素和木栓酮对三种贴壁肿瘤细胞抑制率 (%) 的比较

受试物*	A <sub>375</sub> 细胞		L <sub>929</sub> 细胞		Hela 细胞	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
去甲斑蝥素	38.6	50.4	40.5	34.4	34.1	43.7
木栓酮	36.7	88.6	37.6	81.1	71.6	86.0

\*两种受试物的浓度均为 120μmol/L。

5.2.5 结论

从 EZR<sub>2002</sub> 中分离得到的木栓酮单体组分对 A<sub>375</sub>(人黑色素瘤)、L<sub>929</sub>(小鼠肺上皮癌)、Hela (人宫颈癌)、THP-1 (人巨噬组织瘤) 四种癌细胞的增殖均有不同程度的抑制作用, 且其抑制率具有时间和剂量的依赖性。

木栓酮试样在 24h 时即对 Hela 细胞和 THP-1 细胞体现出较为明显的作用, 说明木栓酮对上述细胞的敏感性较高, 而对 A<sub>375</sub> 细胞和 L<sub>929</sub> 细胞的敏感性稍差。

与阳性药物 (去甲斑蝥素) 的抑制效果比较, 表明木栓酮具有相当强的抗癌活性, 可以作为抗癌药物和保健品加以开发, 同时也证明了木栓酮是 EZR<sub>2002</sub> 中存在的主要抗癌活性成分。

例6 EZR<sub>2002</sub> 的皮肤生理活性

为了评价 EZR<sub>2002</sub> 在日用化妆品领域的应用前景, 申请者又委托复旦大学公共卫生学院皮肤生理毒理研究室对 EZR<sub>2002</sub> 的皮肤生理功效进行了测试。

6.1 实验材料与方法

6.1.1 受试物 EZR<sub>2002</sub> 用 DMSO 溶解, 经 0.22μm 滤膜抽滤除菌, 以无血清 DMEM 稀释为受试浓度, 终浓度为 0.5%、0.05%、0.005%和 0.0005%。-4℃ 保存。以无血清 DMEM 作为对照。

6.1.2 试剂器皿 K-SFM 培养基 (Gibcol 公司, USA)、DMEM 培养基、胰岛素、小牛血清 (NBS)、氢化可的松、青霉素、链霉素、胰蛋白酶、Ficoll、96 孔板及 24 孔板、及 35mm 培养皿和 25cm<sup>2</sup> 培养瓶 (Corning 公司, USA)。

6.1.3 仪器 酶标仪 (BIO-TEK 公司)、pH 计、超净台、培养箱、722 分光光

度计。

6.1.4 皮肤细胞原代培养 取出生三天的 SD 大鼠背部皮肤,采用 0.25%胰酶冷消化法制备皮肤表皮角元细胞,以 K-SFM 培养基;细胞密度调整至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,接种于 96 孔板、24 孔板。24h 换第一次液,然后每 2~3 天换液。当上述培养细胞生长至 80%融合时,加入受试物。

6.1.5 脂质过氧化产物(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测定 MDA 测定采用 TBA 比色法, SOD 测定采用亚硝酸盐还原法, 试剂盒由南京建成生物公司提供。

6.1.6 安全性评价测试 根据 1999 年国家卫生部颁布的《化妆品卫生规范》中的评价程序和方法进行。受试物浓度为 10%。皮肤刺激试验:取受试物 0.2ml 涂于皮肤上每天一次,每次 1h,连续 14 天;眼刺激试验:将受试物 0.1ml 滴入结膜囊中,于染毒后 1、24、48、72h 以及第 4 天、第 7 天对动物眼睛进行检查。

## 6.2 结果

6.2.1 延缓皮肤衰老的作用 EZR<sub>2002</sub> 在 0.0005%~0.005%剂量(即 5~50mg/kg)范围内使皮肤细胞的 MDA 非常显著地低于对照组, SOD 活性明显高于对照组,见表 9。

表 9 EZR<sub>2002</sub>对皮肤角质形成细胞 MDA 生成与 SOD 活性的影响

试样浓度 (%)	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照	1.66±0.22	2.94±0.085
0.0005	0.60±0.21**	3.21±0.081*
0.005	0.58±0.33**	3.36±0.024*
0.05	2.66±0.42	2.43±0.115
0.5	4.60±0.67	0.93±0.47

注: \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 与对照相比。

6.2.2 安全性 皮肤刺激试验及眼刺激试验结果均为阴性,显示无皮肤及眼刺激性。

## 6.3 结论

EZR<sub>2002</sub> 在 5~50mg/kg 的剂量下具有较强的抗氧化损伤作用,能够增强皮肤 SOD 的活性,减少氧化产物 MDA 的生成,具有在护肤、护发等日用化妆品中应用的良好生理学功效。



# 说明书附图

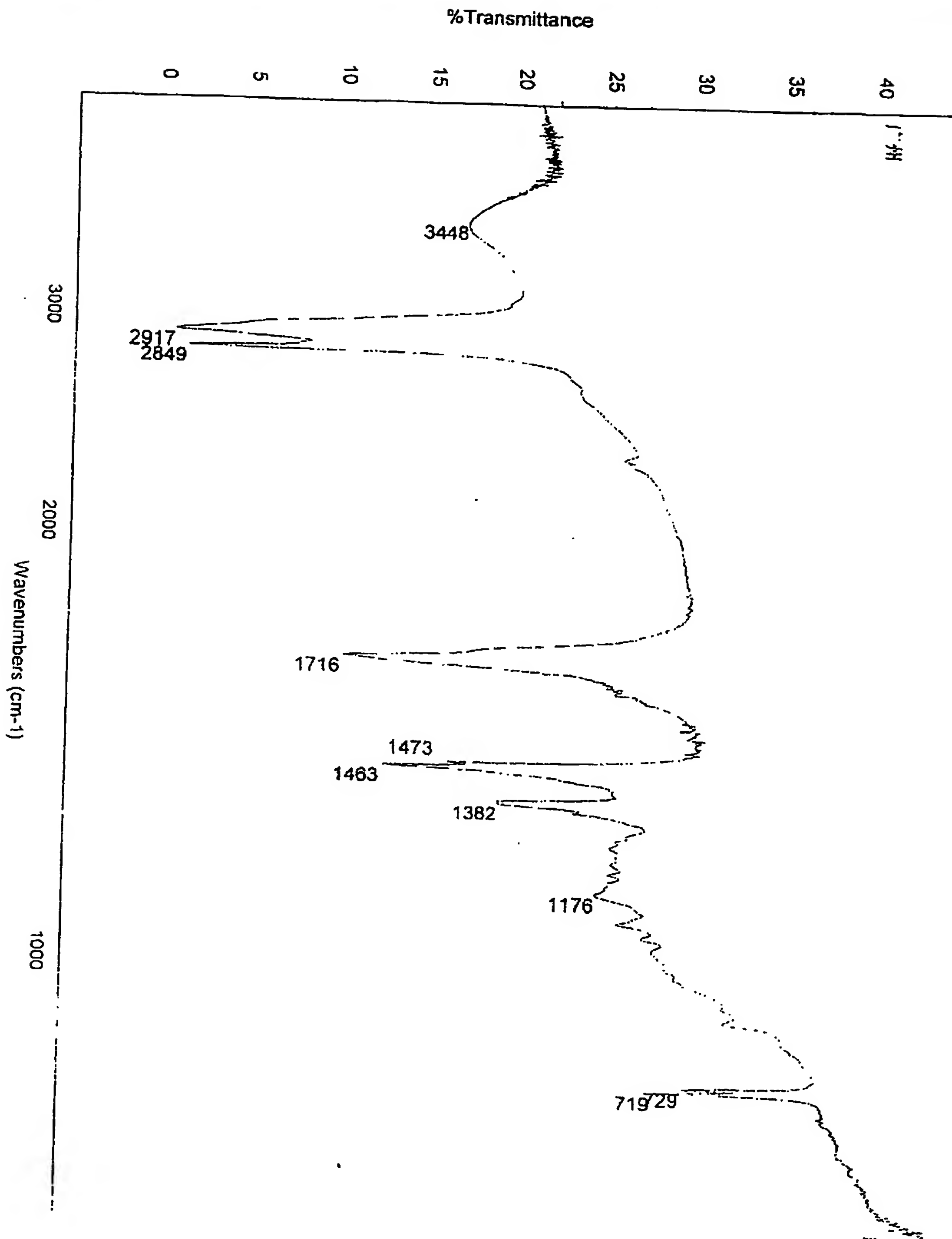


图 1.



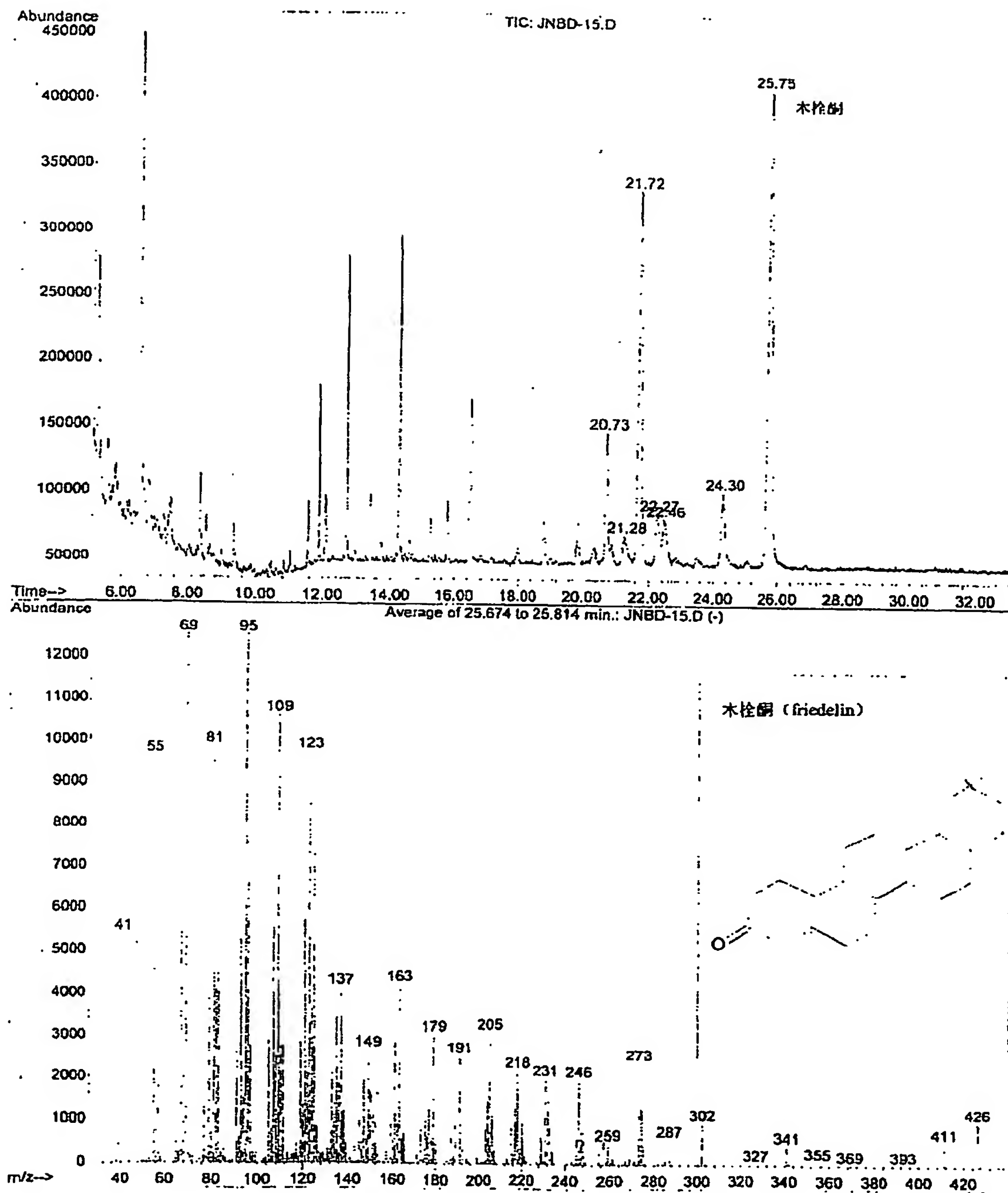


图 3



00-12-01

33

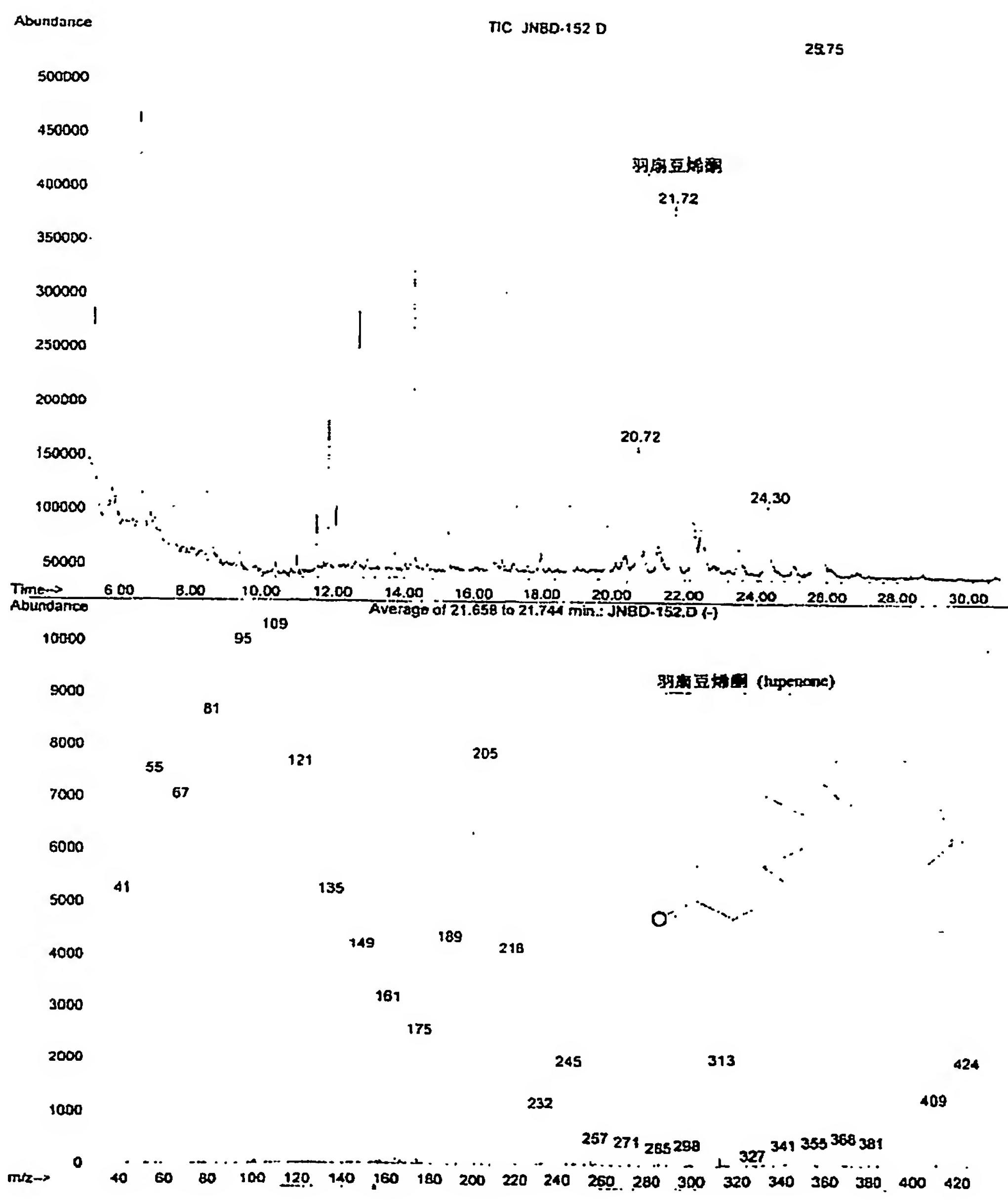


图 4

00-12-18

26

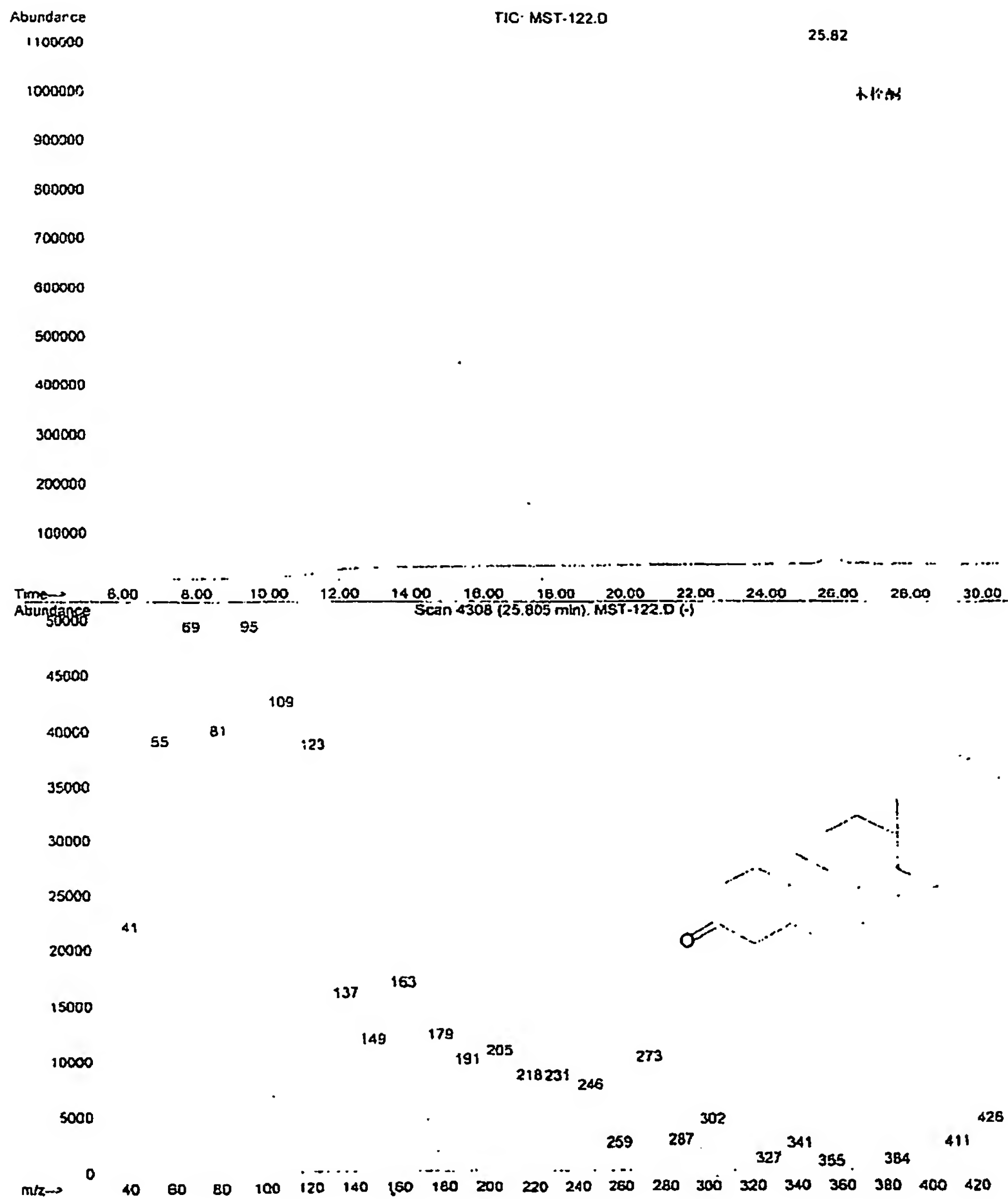


图 5

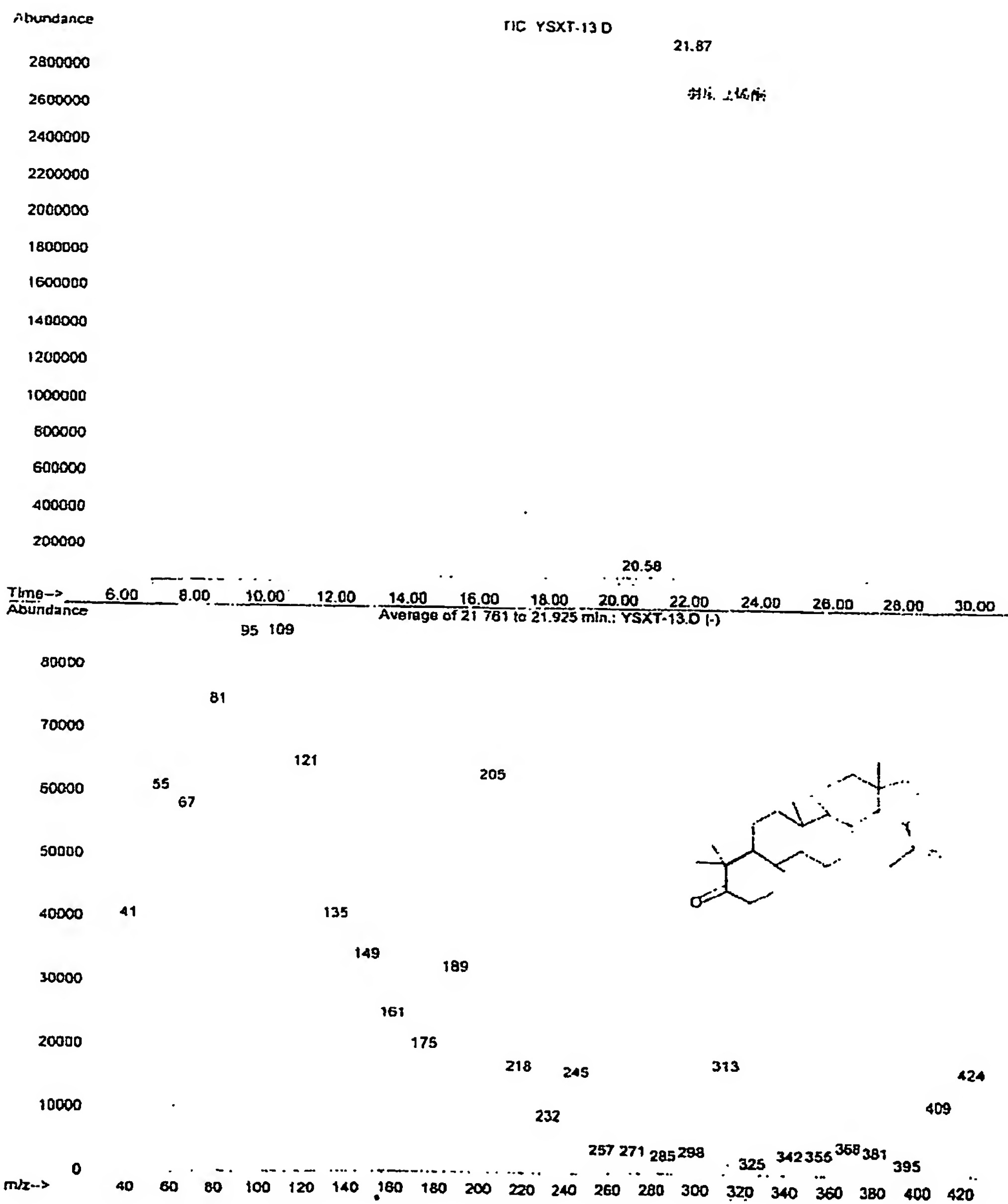


图 6